Lane Medical Library

Aus dem Hygienischen Institut der Albertus-Universität
zu Königsberg (Pr)
Direktor: Professor Dr. Bürgers

STANFORD UNIVERSITY
15 MAR 1939
LIBRARY

Beeinflussung von Diphtheriebazillen durch Speichel.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Albertus-Universität zu Königsberg (Pr)

vorgelegt von

Johanna Krack
approb. Zahnärztin

Königsberg (Pr)
1935

Koh. Raabe, Königsberg-Pr

Referent: Professor Dr. B ü r g e r s

Beeinflussung von Diphtheriebazillen durch Speichel.

Schon vor mehreren Jahren sind Versuche über die Wirkung des Speichels auf Bakterien gemacht worden. So haben Sanarelli und Florain dem Speichel eine bakterizide Kraft zugeschrieben, haben aber ausdrücklich betont, daß Diphtheriebazillen und Pneumokokken davon nicht betroffen werden. Fleming hat auf das Vorkommen von bakterienauflösenden Stoffen im Serum und in andern tierischen und menschlichen Flüssigkeiten hingewiesen. Diese Stoffe, die er Lysozyme nannte, sind aber nur gegen gewisse saprophytische Bakterien gerichtet, während pathogene Bakterien von den Lysozymen nicht angegriffen werden. Marguerite Bordet hat dieses lytische Ferment auch im Speichel (Hundespeichel) nachweisen können.

Einige Jahre später wurde die Wirkung des menschlichen Speichels auf Diphtheriebazillen von Dold und Weigmann genauer untersucht. Es konnte nachgewiesen werden, daß der menschliche Speichel auf Diphtheriebazillen entwicklungshemmend, ja sogar keimtötend wirkt. Ferner, daß die Diphtheriebazillen unter der Einwirkung von frischem Speichel in Pseudodiphtheriebazillen verwandelt werden können. Diese Umwandlung der echten Diphtheriebazillen in Pseudodiphtheriebazillen durch Speichel war in einem bestimmten frühen Stadium durch Rückimpfung auf Blutagar noch reversibel, in einem späteren Stadium jedoch nicht mehr.

Die Wirkung des menschlichen Speichels gegenüber echten, virulenten Diphtheriebazillen war bei 7 untersuchten Individuen verschieden stark ausgeprägt. Der Verfasser nimmt daher an, daß ein gewisser Prozentsatz aller Speichel diese Wirkung nur in sehr geringem Grade oder gar nicht besitzt.

In einer anderen Arbeit haben Dold und Weigmann gezeigt, daß Diphtheriebazillen, die sie Meerschweinchen und Affen auf die Nasen- und Rachenschleimhäute brachten, in wenigen Tagen verschwunden waren und daß teilweise Diphtheroide und Pseudodiphtherie-

bazillen auftraten, die sie vor Beginn des Versuchs in Nasen und Rachen der Tiere nicht beobachtet hatten. Diese Feststellung führte zu der Vermutung, daß die auf die Nasen- und Rachenschleimhaut der Meerschweinchen und Affen gebrachten Diphtheriebazillen dort in Diphtheroide und Pseudodiphtherie umgewandelt werden. Diese Umwandlung und die festgestellte Rachen- und Nasenimmunität gegen Diphtherie könnte eine Funktion der Rachen- und Nasenschleimhäute oder der Speichel- und Nasensekrete oder beider zusammen sein. Dold ist auf Grund seiner Untersuchungen der Meinung, daß diese Rachen- und Nasenimmunität gegen Diphtherie bei den genannten Tieren durch die Wirkung des Speichels bedingt wird und nicht durch die Rachen- und Nasenschleimhäute. Er glaubt ferner, daß das Verhalten des Speichels gegenüber den Diphtheriebazillen auch für die Pathogenese und Epidemiologie der menschlichen Diphtherie von mindestens gleicher, wahrscheinlich aber größerer Bedeutung ist als der Gehalt des Blutes und der Gewebe an Diphtherieantitoxin.

Untersuchungen über die Umwandlung von Diphtheriebazillen in Pseudodiphtheriebazillen und umgekehrt von Pseudodiphtheriebazillen in echte Diphteriebazillen sind schon von vielen Autoren gemacht worden. Erwähnt seien hier nur die Arbeiten von Bernhardt u. Paneth, Bitter, Gundel und Sancho, Levinthal, Kliewe u. a. Alle konnten nachweisen, daß es durch verschiedene Einflüsse möglich ist, den echten Diphtheriebazillus so zu verändern, daß Bakterien entstehen, die den Charakter der Diphtheroiden, aber nicht den der echten Pseudodiphtherie annehmen. Durch Rückverpflanzung der veränderten Bakterien in günstige Wachstums- und Lebensbedingungen können sie wieder rückgängig gemacht werden. Es gibt aber auch Diphtheriestämme, welche die abgewandelten Eigenschaften viele Generationen hindurch behalten und nicht zum Typus der rechten Diphtherie zurückkehren. Verhältnismäßig leicht läßt sich die Virulenz beeinflussen. Es ist also bisher gelungen, echte Diphtheriebazillen in Diphtheroide und diese wieder in echte Diphtheriebazillen zu verwandeln. Eine Umwandlung echter Diphtheriebazillen in echte Pseudodiphtheriebazillen und eine Umwandlung echter Pseudodiphtheriebazillen in echte Diphtheriebazillen ist den genannten Autoren anscheinend noch nie gelungen.

Dold und Weigmann haben die entwicklungshemmende bis keimtötende Wirkung des menschlichen Speichels auf Diphtheriebazillen auf folgende Art nachgewiesen. Sie versetzten Speichelproben mit Diphtheriebazillen zu gleichen Teilen, hielten die infizierten Speichelproben 15—20 Stunden bei 37° C. und verimpften sie dann auf Claubergplatten. Zur Kontrolle wurden die Speichelproben auch in inaktiviertem Zustande ($^1/_2$ stündige Erhitzung auf 56° C) mit den gleichen Mengen der gleichen Diphtheriebazillen infiziert und auf Claubergnährboden verimpft. Die in den frischen Speichel eingesäten Diphtheriebazillen sind so reduziert worden, daß bei Aussaat auf den Clauberg-schen Nährboden nur noch wenige Kolonien zur Entwicklung kamen, während die Aussaat der inaktivierten Speichelprobe ein massenhaftes Kolonienwachstum ergab. Auch Bruno Besta und Helga Kuhn haben nachweisen können, daß die Hemmung des Diphtheriebazillenwachstums ausblieb, wenn der Speichel auf 56° C erhitzt wurde und auch, wenn er durch Berkefeld-Filter filtriert war.

Die Frage, ob eine Umwandlung der echten Diphtheriebazillen in Diphtheroide und weiter in Pseudodiphtheriebazillen unter der Einwirkung des menschlichen Speichels erfolgt oder nicht, konnte nur so geklärt werden, daß man Diphtheriebazillen durch möglichst häufige Uebertragung den Einfluß frischen Speichels aussetzt. So wurde durch Vorversuche zunächst ermittelt, daß die (auf 50° C abgekühlten) Speichelagarmischung aus einem Teil frischem Speichel und neun Teilen Agar für die Umwandlungsversuche am günstigsten ist. Zur Kontrolle wurde eine mit dem gleichen Speichel hergestellte Platte 24 Stunden bei 37° C bebrütet. Hierauf wurde die Oberfläche mit einer großen Oese auf einer Loeffler-Clauberg-Platte verimpft. Waren bei dieser Kontrolle Diphtheroide bzw. Pseudodiphtheriebazillen gefunden worden, so wurde der Hauptversuch nicht angestellt.

Hauptversuch. Auf die Speichelagarplatte wurde 18—20 stündiges Kulturmaterial eines Diphtheriestammes (Einzellkultur) ziemlich dick aufgeimpft. Nach 24 stündiger Bebrütung wurde auf eine zweite kontrollierte Speichelagarplatte geimpft. Auf diese Weise wurde alle 24 Stunden auf die Oberfläche neugegossener Frisch-Speichelagarplatten, die im Vorversuch als frei von Pseudodiphtherie befunden

worden waren, übertragen, wobei jeweils die makroskopische, mikroskopische und färberische Beschaffenheit der gewachsenen Bazillen, von Zeit zu Zeit auch ihre Pathogenität geprüft wurde. Nach der 45. Speichelagarpassage wurde eine Rückimpfung auf Blutagarplatten vorgenommen. Die ursprünglichen Eigenschaften des Diphtheriestammes konnten aber auch durch sehr lange fortgesetzte Rückimpfungen von Blutagar auf Blutagar nicht wiederhergestellt werden. Bei einer andern Versuchsreihe wurde schon nach der 9. Speichelagarpassage auf Blutagar rückverimpft und schon nach 4 Blutagarpassagen hatten die stark veränderten Bazillen wieder ihre typischen Formen und Eigenschaften wiedererlangt.

Dold hat nur mit unfiltriertem Speichel gearbeitet, da er glaubte, daß Filtration die Wirkung des Speichels herabsetze. Da bei dieser Methode trotz Vorbebrütung Fehler nicht absolut ausgeschlossen sind, habe ich absichtlich von der Dold'schen Technik abweichend in unsern Versuchsreihen verschiedene Methoden angewandt.

Zu meinen ersten Versuchen benutzte ich filtrierten Speichel, der durch Seitzfilter vorfiltriert und durch die Berkefeld-Kerze nachfiltriert wurde. Vor der Beimpfung wurde erst stets eine Sterilitätskontrolle gemacht. Als Nährböden benutzte ich Ascitesbouillon und einen synthetischen Nährboden, wie er von H. Braun und Hofmeier angegeben ist. Die Zusammensetzung dieses synthetischen Nährbodens ist folgende:

Na_2SO_4	0,5
$MgSO_4$	0,005
KH_2PO_4	0,05
K_2HPO_4	0,15
asparaginsaures Natrium	0,5
Cystin	0,0125
essigsaures Natrium	0,5
Aqua bidest.	ad 100,0

Die Ascitesbouillon und der synthetische Nährboden wurden je zu gleichen Teilen mit dem filtrierten Speichel vermischt. Zur Kontrolle wurde noch Ascitesbouillon und physiologische Kochsalzlösung im Verhältnis 1 : 1 hinzugenommen. Diese drei Nährmedien wurden mit zwei Diphtheriestämmen, von denen zuvor eine Virulenzbestimmung

gemacht war, und mit einem Pseudodiphtheriestamm beimpft. Der letztere wurde nur zur Kontrolle mitgeführt. Nach 48 stündiger Bebrütung wurden 0,1 ccm auf frische Nährböden überimpft und Präparate nach Gram und Neisser hergestellt. Nach weiteren 48 Stunden wurde wieder weiterüberimpft, wieder Präparate gemacht und so weiter bis zur 20. Passage. Auf diese Weise weiterzuarbeiten schien zwecklos zu sein, weil die Diphtheriebazillen sich morphologisch und färberisch nicht geändert hatten. Ein weiterer Grund für die Unterbrechung dieses Versuchs war die Verunreinigung der Bouillonkulturen mit Luftkeimen, die immer wieder vorkam. Oft mußte auf Levinthalplatten ausgestrichen werden, um die Stämme wieder in Reinkultur zu bekommen.

Es folgten Versuche mit Speichelagarplatten, die sich aus 9 Teilen Agar und 1 Teil Speichel zusammensetzten. Zunächst wurden wieder derselbe filtrierte Speichel und dieselben Diphtherie- bzw. Pseudodiphtheriestämme verwandt. Alle 24 Stunden wurde auf neue Platten überimpft und Präparate nach Gram und Neisser gemacht. In den Anfangspassagen wuchsen die Diphtheriebazillen der Kolonieform nach relativ gut. Es waren meist große, trockene Kolonien mit leicht gezacktem Rand. Bis zur 30.—35. Passage blieben die Kolonien noch ziemlich groß und wenig verändert. Ganz plötzlich wurden sie aber klein und zart und so blieben sie auch weiterhin. Dieser makroskopischen Veränderung entsprach auch die mikroskopische. Während die Bazillen bei der 20. Ueberimpfung noch unverändert, bei der 30. wenig verändert waren, zeigte die 33.—35. Passage sehr feine kurze Stäbchen ohne Polkörnchen. Danach fand sich die Polfärbung bei einem Teil der Stäbchen wieder ein. Dieser Versuch wurde bis zur 50. Passage weitergeführt. Um einen kurzen Ueberblick zu geben, sollen hier 5 Passagen der ganzen Versuchsreihe wiedergegeben werden.

Diphtheriestamm 16895

1. Passage. Ziemlich kurze, schlanke Bazillen mit sehr reichlichen Polkörnchen.
10. Passage. Formen noch unverändert, schlank. Polfärbung gut.
20. Passage. Formen unverändert, noch reichlich PK.
30. Passage. Kurze, schlanke Bazillen, nur noch wenig PK.

40. Passage. Sehr kurze, plumpe Formen, nur noch ganz vereinzelt PK.
50. Passage. Kurze sehr plumpe Formen ohne PK.

Diphtheriestamm 28752

1. Passage. Die Stäbchen noch etwas kürzer als bei 16895, Polkörnchen reichlich.
10. Passage. ebenso.
20. Passage. Formen etwas kürzer, etwas weniger PK als bei 16895.
30. Passage. Kurze, z. T. septierte Stäbchen, wenig PK.
40. Passage. Noch kürzere Stäbchen als bei 16895, fast ohne PK.
50. Passage. Seit der 47. Passage verunreinigt mit gramnegativen Stäbchen.

Bei diesen hier beschriebenen Passagen ist deutlich zu sehen, daß die Diphtheriebazillen nur ganz allmählich ihre Form geändert haben. Ich möchte behaupten, daß der Speichel in diesem Falle kaum etwas zu der Veränderung beigetragen hat. Es ist anzunehmen, daß nach 50 Passagen über einfache Agarplatten, einem für Diphtheriebazillen nicht besonders geeigneten Nährboden, das mikroskopische und auch das makroskopische Bild fast das gleiche gewesen wäre. — Nach der letzten Ueberimpfung wurde eine Virulenzprobe gemacht, um zu sehen, ob und inwieweit die Virulenz des Stammes 16895 verlorengegangen war. Das Material wurde direkt von der Speichelagarplatte abgenommen und in physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt. $^1/_2$ Oese davon wurde einem Meerschweinchen subkutan eingespritzt. Das Tier starb nach zwei Tagen unter charakteristischen Erscheinungen. Bei der zu Beginn des Versuchs gemachten Virulenzprobe tötete $^1/_{100}$ Oese subkutan. Die Virulenz war also auch nach dieser großen Anzahl von Passagen nicht verlorengegangen, nur herabgesetzt.

Denselben Versuch machte ich noch einmal, aber mit einem andern Speichel, und zwar mit dem Speichel eines Rauchers, im Gegensatz zum andern, der von einem Nichtraucher stammte. Es wurden vier andere Diphtheriestämme verwandt, die auf dieselbe Art, wie oben beschrieben, täglich überimpft wurden. Zur Veranschaulichung seien drei Beispiele von der 1., 4. und 8. Passage angeführt.

1. Passage.

1. Lange Formen, sehr selten Polfärbung.
2. Etwas kürzere Stäbchen als bei 1, keine PK.
3. Formen plump, etwa $^2/_3$ mit PK.
4. Mittelgroße, schlanke Formen, sehr selten Polfärbung.

4. Passage.

1. Kurze, plumpe, größtenteils septierte Stäbchen ohne Polfärbung.
2. wie 1.
3. Kurze, mittelplumpe Bazillen mit sehr wenig PK, einige sehr große Formen, das ganze Bild sehr polymorph.
4. Mittelgroße, z. T. auch kurze, aber ziemlich schlanke Stäbchen, nur ganz vereinzelt PK.

8. Passage.

1. Mittelgroße, schlanke Stäbchen ohne PK.
2. Im ganzen kürzer und plumper als 1, ohne PK.
3. Mittelgroße, ziemlich plumpe Stäbchen, ganz vereinzelt PK.
4. Mittellange und kurze, plumpe Stäbchen ohne PK.

Nach der 10. Passage, die dasselbe Bild wie die 8. Passage zeigte, wurde dieser Versuch beendet. Nach der 4. und 8. Passage wurden Virulenzproben an Meerschweinchen gemacht, die noch positiv ausfielen ($^1/_{10}$ Oese intrakutan). Das makroskopische Aussehen auf der Speichelagarplatte war nicht bei allen Stämmen das gleiche. Während die Stämme 1, 2 und 4 relativ groß, etwas weißlich und trocken mit gezacktem Rand wuchsen, zeigte Stamm 3 (Mitis) relativ große, farblose, glatte und vor allem glänzende, runde Kolonien. Auch mikroskopisch verhielt sich dieser Stamm etwas anders als die übrigen drei. Während die Stäbchen der Stämme 1, 2 und 4 nach der 8. Passage keine Polkörnchen mehr hatten, waren sie bei dem dritten Stamm auch noch nach der 10. Ueberimpfung vorhanden.

Im ganzen läßt sich sagen, daß der letzte Speichel einen bedeutend größeren Einfluß auf die Diphtheriebazillen hatte, als der zuerst verwandte.

Um festzustellen, ob das Rhodankalium des Speichels vielleicht einen entscheidenden Einfluß bei der Veränderung der Diphtheriebazillen ausübt, machte ich spezielle Versuche mit Rhodankalium enthaltenden Nährböden. Zu diesem Zweck wurden drei verschiedene Konzentrationen in einfacher Bouillon hergestellt:

5 mg auf 100 ccm Bouillon
10 mg auf 100 ccm Bouillon
15 mg auf 100 ccm Bouillon.

Je 5 ccm wurden in Röhrchen abgefüllt und dann nach 24 stündiger Sterilitätskontrolle mit zwei Diphtheriestämmen beimpft. Nach 48 stündiger Bebrütung wurden Präparate von allen hergestellt und 0,1 ccm auf neue Röhrchen überimpft. Das Wachstum war bei beiden Stämmen häutchenbildend und blieb auch bis zum Schluß so. Nach weiteren 48 Stunden wurde auf neue Röhrchen übertragen und das so weiter bis zur 20. Passage. Ich unterbrach diesen Versuch, weil die Diphtheriebazillen sich während der ganzen Zeit kaum geändert hatten und die Kulturen einige Male verunreinigt waren. Eine Kontrollüberimpfung von der 4. Passage über Bouillon auf Levinthalplatten zeigte einen deutlichen Unterschied in den Kolonieformen. Es war gut zu erkennen, daß die Größe der Kolonien mit der Menge des Rhodankaliumzusatzes abnahm. Nach der 10. Passage war dieser Unterschied kaum mehr sichtbar.

An Stelle der Bouillon verwandte ich dann Levinthalagar, der auch denselben Zusatz von Rhodankalium hatte, also

5 mg auf 100 ccm Levinthalagar
10 mg auf 100 ccm Levinthalagar
15 mg auf 100 ccm Levinthalagar.

Hiervon wurden Platten hergestellt. Diese Platten wurden mit vier Diphtheriestämmen beimpft, und zwar mit denselben, die für den zweiten filtrierten Speichel verwandt wurden. Alle 24 Stunden wurden neue Platten beimpft und Präparate nach Gram und Neisser hergestellt. Da die geringere Konzentration von 5 mg und 10 mg auf 100 ccm Levinthalagar nach 10 Passagen gar keine Veränderung bewirkt hatte, arbeitete ich von da ab nur noch mit dem Nährboden, der 15 mg Rhodankalium enthielt. Auf den Levinthalplatten konnte man die Beobachtung der verschiedenen Größe der einzelnen Kolonien bei den verschiedenen Zusätzen von Rhodankalium nicht mehr machen. Auch das verschiedene Aussehen der einzelnen Stämme, wie es auf den Speichelagarplatten deutlich zu sehen war, konnte man auf Levinthal nicht erkennen. Der Mitisstamm wuchs hier wie alle andern. Die Form der Diphtheriebazillen schwankte bei den einzelnen Passagen ganz erheblich.

Immer wieder konnte man Rückschläge beobachten, wie es an folgenden Beispielen auch sichtbar ist. Die Präparate der Diphtheriebazillen von den 5 mg und 10 mg enthaltenden Nährböden sollen hier außer Acht gelassen werden, weil sie bedeutungslos sind.

1. Passage.

1. Lange, schlanke Stäbchen, fast alle mit guten PK.
2. Etwas kürzere Stäbchen als bei 1, mit guten PK.
3. Schlanke, typische Formen, überall PK.
4. Schlanke Bazillen mit reichlichen PK.

10. Passage.

1. Mittellange, plumpe Formen, sehr wenige mit PK.
2. Plumpe und auch schlanke Formen, sehr wenig PK.
3. Schlanke, typische Formen, PK überall vorhanden.
4. Schlanke Formen, vereinzelt plumpe, sehr wenig PK.

14. Passage.

1. Mittelschlanke Formen, größtenteils mit Polfärbung.
2. Lange Stäbchen mit vielen PK.
3. Lange, schlanke Formen, sehr viel PK.
4. Lange, schlanke Formen, reichlich PK.

22. Passage.

1. Hauptsächlich kurze Stäbchen, wenig PK.
2. wie 1.
3. Mittellange Stäbchen, wenig PK.
4. Mittelgroße und kurze Stäbchen ohne PK.

30. Passage.

1. Längere und kürzere Formen ein kleiner Teil mit PK.
2. Formen im ganzen kleiner als 1, wenig PK.
3. Lange, schlanke Stäbchen, wenig PK.
4. Feinere und plumpere, mittelgroße Stäbchen, wenig PK.

Nach 30 Passagen beendigte ich diese Versuche, da die Form der Diphtheriebazillen sich nicht wesentlich verändert hatte. Besonders Stamm III behielt bis zum Schluß die langen typischen Formen. Eine Virulenzprobe wurde nicht gemacht.

Bei den bisherigen Versuchen wurde nur gezeigt, welche Wirkung filtrierter Speichel auf das Wachstum von Diphtheriebazillen hat. Jetzt sollen noch die Versuche beschrieben werden, die ich mit frischem Speichel ausgeführt habe. Ich hielt mich in der Ausführung im wesentlichen an die Methode, wie sie in der Arbeit von Dold und Weigmann angegeben ist.

Frischer Speichel und im Wasserbad auf 50° C abgekühlter Agar wurden im Verhältnis 1 : 10 zu einer Platte verarbeitet. Es wurden Speichel von drei Personen benutzt. Bevor die Platten beimpft wurden, wurde je eine Kontrollplatte 24 Stunden in den Brutschrank gestellt, um zu sehen, ob etwa schon von vornherein Pseudodiphtherie auf den Platten vorhanden war.

H. Laub hat nämlich bei einer genauen Untersuchung von 104 Speichelproben gesunder Menschen in 80 Fällen Pseudodiphtheriebazillen nachgewiesen und 64 Stämme reingezüchtet.

Die Platten wurden nun nach 24stündiger Bebrütung mit einer großen sterilen Oese abgestrichen. Dieses abgestrichene Material wurde auf eine Claubergplatte gebracht und diese wurde dann 24 Stunden bebrütet. Die Claubergplatte blieb steril.

Der Behauptung Dolds, daß das Aussehen der Speichelplatten sich auch nach mehrtägiger Bebrütung kaum ändert und keine Kolonieentwicklung auf der Oberfläche zeigt, kann ich mich nicht ganz anschließen. Meine Platten waren schon nach 24stündiger Bebrütung bei 37° C vollkommen undurchsichtig. Auch auf der Oberfläche waren stets kleinere oder größere Kolonien vorhanden. Sogar im Eisschrank waren zuweilen nach 48 Stunden einzelne Kolonien ausgewachsen, so daß ich 48stündige, vorschriftsmäßig auf Diphtheroide bzw. Pseudodiphtherie geprüfte Platten nicht verwenden konnte. Ich benutzte 24stündige Platten und wertete die betreffende Passage nicht, bei der es sich nach weiteren 24 Stunden herausstellte, daß sie Pseudodiphtherie enthielt.

Die drei verschiedenen Speichelplatten wurden reichlich dick mit zwei Diphtheriestämmen beimpft. Nach 24 Stunden konnte man nur einen wenig gewachsenen Kulturrasen erkennen. Von diesem Rasen überimpfte ich auf neue kontrollierte Platten und führte dies bis zur 10. Passage fort. Der Versuch scheiterte daran, daß die Diphtheriestämme auf den stets stark ausgewachsenen Platten unmöglich reinzuhalten waren. Es ist vielleicht möglich, daß die verarbeiteten Speichel zu diesen Versuchen ungeeignet waren; denn einige Male hatten die Platten einen ausgesprochenen sauren Geruch. Durch die starke Säurebildung war das Wachstum der Diphtheriebazillen fast vollständig gehemmt.

Um eine Erklärung für die starke Säurebildung und die damit verbundene Wachstumshemmung zu finden, bestimmte ich den pH Gehalt der drei Speichel sowohl in frischem als auch in filtriertem Zustande. Dies geschah auf folgende Weise:

1 ccm Speichel wurde mit 1 ccm Aqua dest. und 8 Teilen neutraler Bouillon gemischt. Von dieser Mischung wurde der pH-Gehalt sofort bestimmt, zum zweiten Mal nach 24 und zum dritten Mal nach 48 Stunden. Auf dieselbe Art wurde die Wasserstoffionenkonzentration von Mischungen von 1 Teil Speichel, 1 Teil Aqua dest. und 8 Teilen neutralem Agar festgestellt. Dabei stellte es sich heraus, daß die Mischungen nach 24stündigem Brutschrankaufenthalt zunächst sauer wurden, um sich dann nach weiteren 24 Stunden wieder etwas mehr nach dem neutralen hin zu verändern.

Damit erklärte sich die ausgesprochene Wachstumshemmung der Diphtheriebazillen auf einem Teil der unfiltrierten Speichelagarplatten.

Darauf versuchte ich dieselben Versuche noch einmal, aber mit Speichel anderer Personen. Zur einmaligen Kontrolle stellte ich außer den Platten aus frischem Speichel auch solche aus inaktiviertem Speichel her ($^1/_2$ Stunde im Wasserbad von 56° C). Nach 18stündiger Bebrütung wurden die einzelnen Platten miteinander verglichen.

Frisch.

1. sehr viel kleine Kolonien.
2. verhältnismäßig wenig ausgewachsen.
3. sehr dicht mit kleinen Kolonien besät.

Inaktiviert.

1. 1 Kolonie.
2. 2 Kolonien.
3. sehr viel Kolonien, wie 2 frisch.

Man sieht hieran deutlich die Verschiedenartigkeit der einzelnen Speichelproben. Der Unterschied machte sich bei der späteren Verarbeitung immer wieder bemerkbar und zwar in der Art, daß auf der relativ saubersten Platte die Gefahr der sekundären Verunreinigung geringer war als auf den anderen beiden. Die Platten wurden mit vier Diphtheriestämmen beimpft, mit denselben, die schon für die anderen Versuche verwandt waren. Alle 24 Stunden

wurden auf neue Platten überimpft und Präparate angefertigt. Nach den ersten Passagen war auch, wie auf den filtrierten Speichelplatten, Stamm III feuchter gewachsen als die übrigen drei Stämme. Leider war nach 4—5 Passagen ein Teil der Stämme meistens so stark verunreinigt, daß es nicht möglich war, sie weiterzuführen. Nur auf den Speichelagarplatten einer einzigen Versuchsperson gelang es, alle vier Stämme wenigstens bis zur 8. Passage verhältnismäßig sauber zu halten.

Um die dauernde Gefahr der Verunreinigung zu beseitigen und die sich daraus ergebenden Schwierigkeiten zu verhindern, versuchte ich folgendes:

Ich belegte die Platten nach dem Trocknen mit sterilem Cellophanpapier. Dann wurden wieder dieselben vier Stämme dick auf das Cellophan verimpft. Nach 24 Stunden war ein Wachstum noch kaum nachweisbar. Die Platten blieben daher 48 Stunden im Brutschrank. Aber auch jetzt war nur ein sehr kümmerlicher trockener Rasen gewachsen, der sich zur weiteren Ueberimpfung nur mit Kochsalzlösung abnehmen ließ. Es wurden nun alle 48 Stunden neue Platten beimpft und Präparate nach Gram und Neisser hergestellt.

Leider mußte ich schon nach wenigen Passagen feststellen, daß die Diphtheriestämme auch hier nicht sauber blieben. Sie waren sogar noch schneller verunreinigt als diejenigen auf den einfachen Speichelplatten. Aus diesem Grunde möchte ich doch den einfachen unfiltrieten Platten ohne Cellophan den Vorzug geben.

Um einen kleinen Ueberblick zu geben, sollen 2 Passagen einer einfachen unfiltrierten Platte mit denen einer mit Cellophan belegten Platte verglichen werden.

1. Passage.

Ohne Cellophan.

1. Mittelgroße Stäbchen, sehr wenig PK.
2. Etwas kürzere Stäbchen als 1, nur wenig PK.
3. Mittellange Stäbchen, sehr wenig PK.
4. Mittelgroße, schlanke Stäbchen, wenig PK.

Mit Cellophan.

1. Mittelgroße, schlanke Stäbchen mit PK.
2. Ziemlich kurze Stäbchen mit PK.
3. Mit Kokken verunreinigt.
4. Schlanke Stäbchen mit mäßig PK.

4. Passage.

Ohne Cellophan.

1. Mittellange Stäbchen etwa $^1/_3$ mit PK.
2. Mittellange, schlanke, z. T. septierte Stäbchen, mäßig PK.
3. lange, schlanke z. T. auch kürzere plumpe Stäbchen, $^1/_5$ mit PK.
4. Mittelgroße schlanke Stäbchen mit sehr vielen PK.

Mit Cellophan.

1. Mittelgroße Stäbchen ohne PK. Im übrigen fast nur Kokken.
2. Kurze plumpe Stäbchen, nur einzelne mit PK.
3. Mittelgroße plumpe Stäbchen, nur wenig mit PK.
4. Einige mittellange schlanke Stäbchen ohne PK, sonst stark mit Kokken verunreinigt.

Stamm I und IV auf den Cellophanplatten konnten nicht weiter verimpft werden. Bei der nächsten Passage waren auch die beiden anderen Stämme so verunreinigt, daß sie ausgeschaltet werden mußten.

8. Passage.

Ohne Cellophan.

1. Mittelgroße Stäbchen, reichlich PK.
2. verunreinigt mit Kokken und Aktinomyzeten, nur noch wenige Stäbchen ohne PK.
3. Einige kurze Stäbchen mit PK, sehr verunreinigt.
4. Einige kurze, keulenförmige Stäbchen ohne PK. Im übrigen auch Kokken und Aktinomyzeten.

Auf weiteren Passagen war die Verunreinigung noch stärker, so daß eine weitere Ueberimpfung zwecklos war.

Zusammenfassung.

1. Der erste filtrierte Speichel hatte auf Diphtheriebazillen keine Wirkung.
2. Beim zweiten filtrierten Speichel war ein Einfluß auf das Wachstum der Diphtheriebazillen wohl nachweisbar. Doch war die Virulenz des Diphtheriestammes nach 8 Passagen noch nicht verloren gegangen.
3. Hieraus ergibt sich, daß nicht jeder Speichel auf Diphtheriebazillen wachstumshemmend oder im Sinne einer Umwandlung wirkt.
4. Das Rhodankalium übt auf Diphtheriebazillen keinen Einfluß aus.

An dieser Stelle möchte ich Herrn Professor Dr. Bürgers für Ueberlassung des Themas und für die stets bereitwillige Unterstützung bei der Vorbereitung und Fertigstellung der Arbeit meinen verbindlichsten Dank aussprechen.

Literatur.

Bernhardt und Paneth: Zbl. Bakter. I Ref. 57, Beil. 83 (1913).
Besta und Kuhn: Zeitschr. f. Hgy. 116, 520 (1934).
Bitter, Gundel und Sancho: Zbl. Bakter. I Orig. 97 (1926).
Bordet, Marguerite: C. r. Soc. Biol. Paris, 99, 1252—1254 (1928).
Dold und Weigmann: Zeitschr. f. Hyg. 116, 158 (1934); 116, 146 (1934).
Fleming: Ref. Zbl. Hyg. 3, 268 (1923).
Kliewe: Zbl. Bakter. I Orig. 101, 6 (1927).
Laub: Zeitschr. f. Hyg. 112, 222 (1934).
Sanarelli und Florain, Hugenschmidt, Krüger, van der Reis: Zit. im Handbuch der pathogenen Mikroorganismen, Bd. I, S. 255, 724; Bd. 2, S. 355 f.

Lebenslauf.

Ich bin als Tochter des Obergerichtsvollziehers Johann Krack und seiner Ehefrau Henriette, geb. Struck am 5. Juni 1911 in Berlin geboren. Bis zum Jahre 1922 besuchte ich die Schule in Märk. Friedland (Westpr.), von 1922—1927 die Privatschule in Pr. Eylau, von 1927—1928 das Städtische Maria Krause-Lyzeum in Königsberg (Pr). Ostern 1931 erhielt ich am Städt. Körte-Oberlyzeum in Königsberg (Pr) das Reifezeugnis. Von 1931—1934 studierte ich an der Albertus-Universität in Königsberg (Pr) Zahnheilkunde. Nach 7 Semestern legte ich das Staatsexamen ab. Nach bestandenem Staatsexamen erhielt ich im März 1935 die Approbation als Zahnärztin.